

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 861**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/445** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10003091 .5**  
96 Fecha de presentación: **18.09.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2198854**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **COMPOSICIONES ANESTÉSICAS LIPOSOMIALES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA.**

30 Prioridad:  
**18.09.1997 US 59233 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.02.2012**

73 Titular/es:  
**PACIRA PHARMACEUTICALS, INC.**  
**10450 SCIENCE CENTER DRIVE**  
**SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:  
**Kim, Sinil;**  
**Kim, Taehee y**  
**Murdandi, Sharad**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 861 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones anestésicas liposomiales de liberación sostenida

Se reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos serie No. 60/059.233, presentada el 18 de septiembre de 1997.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere a formulaciones liposomiales de compuestos tales como fármacos. Más particularmente esta invención se refiere a métodos para encapsular anestésicos en liposomas multivesiculares con alta eficiencia y tasas de liberación sostenida *in vivo*.

10 Normalmente, la duración de la acción de un anestésico local después de su administración, es lo suficientemente larga como para cubrir el dolor causado durante la mayor parte de los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, la duración de la acción no es lo suficientemente larga como para cubrir la mayor parte del dolor post-quirúrgico, o del dolor producido por muchos procedimientos de diagnóstico invasivos, o por lesiones. La perfusión continua o la infiltración repetida de un anestésico local en una herida quirúrgica, "puerto" de diagnóstico o sitio de la lesión no es práctica. Por lo tanto, una formulación de liberación sostenida de un anestésico local sería útil para el tratamiento del dolor, especialmente a la luz de las tendencias actuales de cirugías ambulatorias y de centros de atención de emergencia. De forma deseable, tales formulaciones son útiles también en el dolor traumático y de diagnóstico.

15 En las publicaciones científicas han sido descritos varios métodos para desarrollar formulaciones de liberación sostenida de anestésicos locales. Por ejemplo, las microesferas de polímero de ácido poliláctico-co-glicólico que contienen bupivacaína y dexametasona han producido anestesia local de larga duración. Se ha demostrado también que formas cristalinas de anestésicos locales tienen una duración prolongada de la acción. Se ha demostrado que la bupivacaína lipófila base libre incorporada a las membranas de liposomas multilamelares y a los liposomas unilamelares grandes cargados con un gradiente de protones tiene una eficacia que dura de 6 a 11 horas.

20 Se están desarrollando liposomas multivesiculares (LMV) como un sistema de administración de fármacos de liberación sostenida basado en lípidos para la administración local, regional o sistémica de fármacos. Se ha demostrado la liberación sostenida de muchos fármacos estables en agua encapsulados en los LMV en modelos animales por las vías de administración intratecal, subcutánea, intraperitoneal y epidural, así como en pacientes humanos por las vías intracerebroventricular, intratecal, subcutánea y epidural. En un ensayo clínico de fase III, aleatorio y multicéntrico de una formulación en LMV del agente citotóxico citarabina se ha demostrado que esta formulación es más eficaz que la citarabina libre en el tratamiento del carcinoma leptomeníngeo.

30 Los LMV se definen como liposomas que contienen múltiples cámaras no concéntricas dentro de cada partícula de liposoma, semejando una matriz "tipo espuma". Tales partículas se distinguen de las vesículas multilamelares (VML), conocidas también como liposoma multilamelar, que contienen múltiples cámaras concéntricas dentro de cada partícula de liposoma. Otra partícula definida es la vesícula unilamelar (VUL), conocida también como liposoma unilamelar, que incluye un único compartimento acuoso interno. La presente invención se refiere a los liposomas multivesiculares (LMV). La técnica anterior describe la preparación de LMV (Kim *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 728, 339-348, 1983).

35 Muchas de las sustancias catiónicas biológicamente activas utilizadas en las técnicas de encapsulación en LMV se utilizan como sales de ácidos minerales monopróticos (por ejemplo, como sales hidroclouros). La técnica anterior ha utilizado tales sales de ácidos minerales monopróticos, comúnmente disponibles, de sustancias catiónicas biológicamente activas para su encapsulación en liposomas sin realizar ninguna modificación para pasar a una sal de ácido mineral diprótico o triprótico. La técnica anterior ha utilizado también ácidos orgánicos tales como los ácidos cítrico o glutámico para efectuar la encapsulación. La técnica anterior adicional incluye el documento WO9703652.

**Sumario de la invención**

45 La invención proporciona anestésicos locales encapsulados en liposomas multivesiculares (LMV), esto es, vesículas lipídicas que tienen múltiples cámaras acuosas internas no concéntricas que tienen membranas internas distribuidas como una red a lo largo de los LMV. Las cámaras contienen ácidos que son eficaces para hacer posible la encapsulación de ciertos anestésicos y para modular la velocidad de liberación de los anestésicos encapsulados. La invención proporciona también métodos para preparar tales composiciones, y para proporcionar anestesia local a los sujetos mediante la administración de las composiciones.

50 La técnica anterior ha utilizado sales monopróticas comúnmente disponibles (por ejemplo, hidrocloruro o glutámico) de compuestos biológicamente activos. Esto ha dado como resultado formulaciones que o son inaceptables para la encapsulación de las sustancias biológicamente activas en LMV o que tienen una eficiencia de encapsulación muy baja. La invención es el resultado del sorprendente hallazgo de que la inclusión de la forma de base libre de los compuestos anestésicos solubilizados con ácido fosfórico, o la conversión de las sales hidrocloros comúnmente disponibles de los compuestos anestésicos en sales fosfato (sal de ácido mineral triprótico) o en sales sulfato (sal de ácido mineral diprótico) para inclusión en las LMV tiene como resultado una mejora considerable de la eficiencia de

encapsulación así como de la liberación sostenida en medios biológicamente apropiados. También se incluyen los ácidos orgánicos polialcohólicos tales como ácido glucurónico o ácido glucónico, en los que dicho ácido está co-encapsulado con los anestésicos para ayudar en la encapsulación y para efectuar la liberación sostenida del anestésico. Sorprendentemente, los ácidos orgánicos polialcohólicos son superiores a los ácidos orgánicos no polialcohólicos, y dan composiciones con una elevada eficiencia de encapsulación y liberación sostenida del anestésico. Los ácidos orgánicos polialcohólicos mejoran considerablemente la encapsulación del anestésico y la aceptabilidad de la formulación. Las sales sulfato y muchas otras sales requieren la inclusión de tales ácidos para formar formulaciones aceptables.

Cuando se administra el anestésico encapsulado como una dosis única intracutánea o subcutánea, la duración de la anestesia y la semivida del fármaco en el sitio de la inyección local aumentan en comparación con la inyección del anestésico sin encapsular. La dosis máxima tolerada del anestésico encapsulado también está considerablemente aumentada en la formulación liposomal con respecto a la inyección del anestésico sin encapsular.

El principal uso de la invención es para preparar formulaciones de liberación sostenida de sustancias biológicamente activas que tienen altas velocidades de difusión a través de las membranas lipídicas de dos capas. El uso de sales de ácidos minerales tanto dipróticos como tripróticos de sustancias biológicamente activas y la co-encapsulación de ácidos orgánicos polialcohólicos hace posible que estos fármacos difíciles de encapsular se encapsulen con facilidad y se liberen lentamente.

Otras características y ventajas de la invención serán claras a partir de la siguiente descripción, y a partir de las reivindicaciones.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un gráfico que presenta el efecto anestésico (número de no respuestas a seis punciones) en función del tiempo después de una dosis única intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulado en LMV que contiene diferentes concentraciones de bupivacaína.

La figura 1B es un gráfico que presenta el efecto anestésico (número de no respuestas a seis punciones) en función del tiempo después de una dosis única intracutánea de hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado a diferentes concentraciones.

La figura 2 es un gráfico que presenta una comparación de la duración de la anestesia para las formulaciones de las figuras 1A (fosfato de bupivacaína encapsulado en LMV, círculos rellenos) y 1B (hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado, círculos vacíos) cuantificada por el "tiempo hasta la mitad de la respuesta máxima (R3)" (eje de ordenadas) frente a la concentración de la dosis administrada (eje de abscisas).

La figura 3A es un gráfico que presenta la cantidad total de bupivacaína (mg) que permanece en un sitio de inyección hasta 72 horas después de una única dosis intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulado en LMV (círculos rellenos) o hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado (círculos vacíos).

La figura 3B es un gráfico que presenta las concentraciones de bupivacaína en suero (ng/mL) hasta 72 horas después de una única dosis intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulado en LMV a una concentración de 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos rellenos) o de 0,5 por ciento (p/v) de hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado (círculos vacíos).

## Descripción detallada

Se cree que el dolor post-quirúrgico o post-traumático tiene su mayor intensidad en el período inmediatamente posterior a la operación o a la lesión y en las 24 horas siguientes. Es posible que un mejor control del dolor post-quirúrgico pueda disminuir las complicaciones pulmonares y gastrointestinales y quizás, acortar la estancia en el hospital. Los opiáceos sistémicos de uso habitual para controlar el dolor durante este período post-quirúrgico pueden deprimir la función pulmonar y hacer más lenta la recuperación gastro-intestinal. Otros agentes antinociceptivos tales como el agente anti-inflamatorio no esteroideo ketorolaco trometamina pueden aumentar las hemorragias y la irritación gastrointestinal en estos momentos de estrés. Puesto que los estímulos nociceptivos que surgen de las intervenciones quirúrgicas o de las lesiones traumáticas normalmente tienen un origen local o regional, la prolongación del bloqueo sensorial local o regional para el control del dolor es un concepto interesante. Por lo tanto, se cree que la mejora del tratamiento con anestésicos locales implica el mantenimiento del nivel de anestesia durante un período prolongado. Desafortunadamente, la semivida de muchos anestésicos es muy corta después de una dosis intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), intratecal (IT), intraarticular (IA), intramuscular (IM), o subcutánea (SC). Por lo tanto, se necesita una preparación de liberación lenta que proporcione una exposición prolongada y sostenida a una concentración terapéutica de un anestésico local. La presente invención se dirige a la producción, composición, y uso de una preparación de este tipo.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que generalmente entienden los expertos normales en la técnica a la que pertenece esta invención.

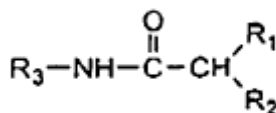
Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares a los descritos aquí, a continuación se describen métodos y materiales apropiados.

### Anestésicos

5 La presente invención proporciona la liberación prolongada de anestésicos locales, particularmente de los anestésicos "tipo amida", desde liposomas multivesiculares después de la administración de composiciones que contienen los LMV. La invención utiliza un anestésico local encapsulado en LMV. Generalmente, el anestésico local pertenece a la clase conocida como los anestésicos de tipo amida. El nombre se deriva de la presencia del enlace amida (-NHCO-) en la porción central de la molécula. El grupo unido al extremo de nitrógeno de la amida es un anillo de fenilo sustituido, especialmente un anillo de fenilo que contiene al menos un grupo alquilo de cadena corta, tal como metilo, etilo, propilo o butilo. Los ejemplos de tales grupos incluyen 2-metilfenilo, 2,6-dimetilfenilo, 2-etilfenilo, 2,6-dietilfenilo, y 2-etil-6-metilfenilo. Si el grupo sustituyente es 2,6-dimetilfenilo, los anestésicos locales se denominan también anestésicos de 2,6-xilidida.

15 El grupo unido al extremo CO del enlace amida se denomina  $CHR_1R_2$ . En la designación anterior,  $R_1$  es una alquilamina secundaria o terciaria tal como N-alquilamina o N,N-dialquilamina. Se prefieren los grupos alquilo de cadena corta (de uno a cuatro átomos de carbono). Los ejemplos incluyen N-etilamina, N-propilamina, N-butilamina, N,N-dimetilamina, N,N-dietilamina, N-etil-N-metilamina, y sustituyentes construidos de forma similar. Las cadenas de alquilo de tres y cuatro miembros pueden tener cualquier configuración, esto es, cadena lineal (*n*-alquilo), o ramificada (*iso*-, *sec*-, o *terc*-alquilo). Alternativamente,  $R_1$  puede ser un grupo alquilenamino secundario o terciario, que además se une a  $R_2$ . Por ejemplo,  $R_1$  y  $R_2$  pueden estar unidos por una cadena de alquilo que contiene nitrógeno secundario o terciario, para formar un anillo de piperidina o pirrolidina N-alquilsustituida. En tales ejemplos, el grupo N-alquilo es preferiblemente una cadena corta (uno a cuatro átomos de carbono), tal como N-metilo, N-etilo, N-propilo o N-butilo, en la que la cadena puede ser lineal o ramificada. El sustituyente de unión  $R_1$ - $R_2$  puede ser 2-piperidilo, 2-pirrolidilo, 3-piperidilo, 3-pirrolidilo, 4-piperidilo o 4-pirrolidilo. Preferiblemente, el sustituyente formado cuando  $R_1$  y  $R_2$  están unidos por una cadena de alquilenamino que contiene nitrógeno secundario o terciario es 2-piperidilo o 2-pirrolidilo. La estereoquímica de los compuestos puede ser R o S, dependiendo de la actividad anestésica más eficiente. Por ejemplo, la ropivacaína comercialmente disponible se encuentra la configuración (S)(-). La bupivacaína se encuentra también en la forma conocida como levo-bupivacaína. En la designación anterior,  $R_2$  es hidrógeno, alquilo de cadena corta (uno a cuatro átomos de carbono) o una cadena de alquilenamino secundario o terciario que se une a  $R_1$ , como se ha descrito antes.

30 Los anestésicos de tipo amida que son útiles en la presente invención se describen por la siguiente estructura:



en la que  $R_1$ , y  $R_2$  son como se ha descrito antes, y  $R_3$  es un anillo fenilo sustituido con alquilo, como se ha descrito antes.

35 Por ejemplo, son ilustrativos de la descripción anterior de los anestésicos tipo amida útiles en la presente invención, bupivacaína, levo-bupivacaína, mepivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína, y ropivacaína.

Los anestésicos deben estar presentes en las composiciones de la invención en concentraciones desde aproximadamente 0,01 % hasta aproximadamente 5,0 % p/v, o preferiblemente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 2,0 % p/v. Los porcentajes en peso se definen como el peso de anestésico por volumen de LMV.

40 Las formas de base libre de los anestésicos locales de la invención se pueden solubilizar. De forma deseable, se forma la sal soluble en agua para su almacenaje y administración desde LMV. La forma de sal se puede introducir en la primera fase acuosa de los LMV como tal, o se puede formar añadiendo la forma de base libre, y suficiente ácido para solubilizar los anestésicos en la medida deseada. La sal puede ser cualquier sal mineral di- o tri-prótica farmacéuticamente aceptable, tal como la sal fosfato o la sal sulfato. También son útiles las sales de ácido polihidroxicarboxílico del anestésico, tales como las sales tartrato, gluconato o gluconurato. Las combinaciones de tales sales son preferibles como componentes de la primera fase acuosa de las composiciones de la invención. Por tanto, los anestésicos de tipo amida están presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención en forma de sales de polihidroxicarboxilato, y sales minerales di- y tri-próticas. Las realizaciones preferidas de la invención son aquellas con una mezcla binaria de sales de anestésico tipo amida, una derivada de un ácido polihidroxicarboxílico, y la otra derivada de un ácido mineral di- o tri-prótico.

50

Liposomas multivesiculares

Las composiciones anestésicas de la invención incluyen también liposomas multivesiculares (LMV) que encapsulan y proporcionan liberación modulada y sostenida de los anestésicos descritos antes. Los LMV se preparan por el siguiente procedimiento. Una emulsión tipo "agua-en-aceite" que contiene una sal de ácido no hidrohálico de cualquiera de los anestésicos descritos antes, se forma a partir de dos fases inmiscibles, una fase lipídica y una primera fase acuosa.

La fase lipídica está compuesta de al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro en un disolvente orgánico volátil. El término "lípido anfipático" se refiere a moléculas que tienen un grupo "de cabeza" hidrófilo y un grupo "de cola" hidrófobo y pueden tener capacidad de formación de membranas. Como se usan en esta memoria, los lípidos anfipáticos incluyen aquellos que tienen una carga negativa neta, una carga positiva neta, y lípidos zwitteriónicos (que no tienen ninguna carga neta en su punto isoeléctrico). El término "lípido neutro" se refiere a aceites o grasas que no tienen capacidad de formación de vesículas por sí mismos, y que carecen de un grupo "de cabeza" cargado o hidrófilo. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero sin limitarse a ellos, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, ésteres de tocoferol, ésteres de esteroles que carecen de un grupo "de cabeza" cargado o hidrófilo, y alcanos y escualenos.

El lípido anfipático se escoge de una amplia gama de lípidos que tienen una región hidrófoba y una región hidrófila en la misma molécula. Son lípidos anfipáticos adecuados los fosfolípidos zwitteriónicos, incluidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, y lisofosfatidiletanolaminas. También son adecuados los fosfolípidos anfipáticos aniónicos tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, y cardiolipinas. También son adecuados los lípidos anfipáticos catiónicos tales como acil-trimetilamonio-propanos, diacil-dimetil-amonio-propanos, y estearilamina.

Los lípidos neutros adecuados son los triglicéridos, ésteres de propilenglicol, ésteres de etilenglicol, y escualeno. Los ejemplos de triglicéridos útiles en la presente invención son trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilinoleína, tributirina, tricaproína, tricapriloína, y tricaprina. Las cadenas grasas de los triglicéridos útiles en la presente invención pueden ser todas iguales, o no ser todas iguales (triglicéridos de cadena mixta), incluyendo todas diferentes. Tanto las cadenas grasas saturadas como las insaturadas son útiles en la presente invención. Los ésteres de propilenglicol pueden ser diésteres mixtos de ácidos caprílico y cáprico.

En la presente invención se pueden utilizar muchos tipos de disolventes orgánicos volátiles, incluyendo éteres, ésteres, éteres halogenados, hidrocarburos, halohidrocarburos, o freones. Por ejemplo, el éter dietílico, cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, Forano, y cualquiera de sus combinaciones son adecuados para uso en la preparación de las composiciones anestésicas de la presente invención.

Opcionalmente, pero de forma muy deseable, se incluyen otros componentes en la fase lipídica. Entre ellos están el colesterol o los esteroides vegetales.

La primera fase acuosa incluye un anestésico, al menos un ácido polihidroxicarboxílico, y al menos un ácido mineral di- o tri-prótico. En algunas realizaciones de la invención, también se incluye el ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico no es un constituyente esencial, sino que más bien es opcional y deseable en algunas realizaciones. Los ácidos minerales di- o tri-próticos incluyen ácido sulfúrico, y ácido fosfórico. También se incluyen en la primera fase acuosa dichos ácidos polihidroxicarboxílicos tales como ácido glucurónico, ácido glucónico, y ácido tartárico. Los ácidos minerales di- y tri-próticos y los ácidos orgánicos polihidroxicarboxílicos están presentes en la primera fase acuosa en concentraciones desde 0,01 mM hasta aproximadamente 0,5 M, o preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 300 mM. Cuando se utiliza ácido clorhídrico, está presente en cantidades inferiores, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM, o preferiblemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 25 mM.

La fase lipídica y la primera fase acuosa se mezclan mediante turbulencia mecánica, tal como mediante el uso de paletas rotatorias o vibratorias, agitación, extrusión a través de estructuras deflectoras o tuberías porosas, mediante ultrasonidos, o mediante atomización con boquillas, para producir una emulsión de agua-en-aceite. Por lo tanto, los anestésicos de la invención se encapsulan directamente en la primera etapa de fabricación de los LMV.

La emulsión completa agua-en-aceite se dispersa entonces en una segunda fase acuosa por los medios descritos antes, para formar esférulas de disolvente suspendidas en la segunda fase acuosa. El término "esférulas de disolvente" se refiere a una gotita esférica microscópica de disolvente orgánico, dentro de la cual están suspendidas múltiples gotitas más pequeñas de solución acuosa. Las esférulas de disolvente resultantes contienen por tanto múltiples gotitas acuosas con el anestésico disuelto en su interior. La segunda fase acuosa puede contener componentes adicionales tales como glucosa, y/o lisina.

El disolvente orgánico volátil se elimina entonces de las esférulas, por ejemplo por evaporación superficial desde la suspensión. Cuando el disolvente se ha evaporado sustancial o completamente, se forman los LMV. Los gases que se pueden usar para la evaporación incluyen nitrógeno, argón, helio, oxígeno, hidrógeno y dióxido de carbono.

Alternativamente, el disolvente volátil se puede separar por burbujeo, evaporación rotatoria, o con el uso de membranas selectivas de disolvente.

#### Método para proporcionar anestesia

5 La invención incluye también un método de proporcionar anestesia regional a un sujeto mediante la administración de las composiciones anestésicas reivindicadas, intracutáneamente, subcutáneamente o por bloqueo de un nervio local o regional. Las dosis se pueden administrar como un bloqueo nervioso (incluyendo hasta el límite de actuar como un bloqueo motor), o como un bloqueo sensorial.

10 El término "terapéuticamente eficaz" referido a las composiciones de esta invención significa que un anestésico presente en la primera fase acuosa dentro de los LMV se libera de una manera suficiente para conseguir un nivel concreto de anestesia. Las dosis exactas variarán dependiendo de factores tales como el anestésico particular, así como de factores del paciente tales como la edad, sexo, estado general, y similares. Los expertos en la técnica pueden tener en cuenta fácilmente estos factores y utilizarlos para establecer las concentraciones terapéuticas eficaces sin recurrir a una experimentación excesiva.

15 Generalmente sin embargo, el intervalo de dosis apropiado para uso humano incluye el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg de anestésico total. El límite superior está limitado por la toxicidad del anestésico particular, y el límite inferior es aproximadamente el 10 % del límite superior.

La invención será descrita además en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación y las propiedades de ciertas realizaciones de la presente invención.

#### 20 **Ejemplo 1: Fabricación de los LMV que contienen fosfato de bupivacaína**

El hidrocloreto de bupivacaína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se convirtió en fosfato de bupivacaína por precipitación inicial de hidrocloreto de bupivacaína acuoso con hidróxido de sodio 1 N para preparar la base libre. Se lavó exhaustivamente el precipitado con agua, y se convirtió después en la sal fosfato con una cantidad equimolar de ácido fosfórico.

25 Para cada lote de la formulación, se añadieron 5 mL de un primer componente acuoso discontinuo que contenía 60 mg/mL de fosfato de bupivacaína, ácido glucurónico 150 mM, ácido clorhídrico 15 mM, y ácido fosfórico 20 mM a un vaso mezclador que contenía un componente lipídico que contenía 5 mL de cloroformo USP (Spectrum Chemical Co., Gardena, CA) como disolvente, y 1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfolina (DEPC) 18,6 mM, dipalmitoil-fosfatidilglicerol 4,2 mM (Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabaster, AL) (un lípido anfipático aniónico), colesterol 30 mM (Avanti Lipids), y tricaprilina 10,8 mM. Se mezclaron el primer componente acuoso inmiscible y el componente lipídico a 16.000 rpm en un mezclador Omni (OMNI International, Gainesville, VA) durante 9 minutos. La emulsión de agua-en-aceite resultante se transfirió a un recipiente mezclador de 50 mL que contenía 25 mL de un segundo componente acuoso discontinuo que contenía 32 mg/mL de glucosa y lisina base libre 10 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se mezcló entonces la mezcla durante 20 segundos a 4000 rpm en un mezclador Omni.

35 La emulsión doble de agua-en-aceite-en-agua resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 L que contenía 275 mL de la segunda fase acuosa continua (glucosa, 32 mg/mL; lisina base libre, 40 mM). Se evaporó el cloroformo durante 15 minutos a un flujo constante (90 L/min) de nitrógeno gas a 37 °C para formar partículas de LMV en suspensión. Se aislaron las partículas de LMV por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos, después se lavaron tres veces con una solución de NaCl al 0,9 por ciento (p/v). Cada lote se almacenó a 2-8 °C y se usó para estudios posteriores antes de 48 horas.

#### 40 **Ejemplo 2: Recuperación de bupivacaína a partir de diferentes formulaciones de LMV**

Se solubilizaron las muestras de bupivacaína añadiendo un volumen equimolar de una solución 1 M del ácido indicado y después añadiendo lentamente, con agitación, agua adicional hasta 60 mg/mL o hasta alcanzar una solución límpida. Se ajustó entonces el pH hasta aproximadamente 5. La concentración final de bupivacaína se determinó por HPLC frente a un patrón interno.

Para cada intento de formulación, la primera solución en fase acuosa contenía el contraion de bupivacaína a 60 mg de bupivacaína por mL, o el límite de solubilidad del contraion de la bupivacaína, a pH 5. Otros parámetros para la fabricación de LMV fueron como se ha descrito antes. La recuperación se refiere al tanto por ciento de bupivacaína en la solución de contraion encapsulada y recuperada en el producto final de LMV. Para el estudio 2, la primera fase acuosa contenía también ácido glucurónico 150 mM. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Recuperación de la bupivacaína encapsulada en LMV a partir de formulaciones que contienen diferentes ácidos

Bupivacaína (mg/mL)	ácido incluido	ácido adicional	recuperación (%)
Estudio 1			
60	fosfórico	-	5,7
60	sulfúrico	-	(agregados)
23	nítrico	-	no se forma LMV
40	clorhídrico	-	no se forma LMV
26	glucurónico	-	34
60	tartárico	-	Agregados
41	acético	-	no se forma LMV
2,2	perclórico	-	no se forma LMV
Estudio 2			
60	fosfórico	glucurónico 150 mM	35
60	sulfúrico	glucurónico 150 mM	16
23	nítrico	glucurónico 150 mM	45
40	clorhídrico	glucurónico 150 mM	16
26	glucurónico	glucurónico 150 mM	48
60	tartárico	glucurónico 150 mM	20
41	acético	glucurónico 150 mM	18
2.2	perclórico	glucurónico 150 mM	no se forma LMV
60	cítrico	glucurónico 150 mM	13
60	málico	glucurónico 150 mM	19
60	succínico	glucurónico 150 mM	20

5 Los resultados de la Tabla 1 demuestran claramente que la adición de un ácido polihidroxiorgánico (en este caso, ácido glucurónico) además de uno de una serie de otros ácidos, incluidos ácidos minerales tripróticos tales como ácido fosfórico, o ácidos polihidroxiorgánicos tales como ácido glucurónico proporciona un notable efecto sinérgico. Este sorprendente descubrimiento lleva a una carga y recuperación de los LMV de la invención más altas que las encontradas previamente.

### Ejemplo 3: Estudios con animales *in vivo* utilizando inyecciones intracutáneas

10 Se utilizaron para los estudios de eficacia cobayas machos con un peso de 800-1000 gramos (Harlan Sprague-Dawley, San Diego, CA). Para los estudios de farmacocinética se utilizaron cobayas machos (Harlan-Sprague-Dawley) con un peso de 400-600 gramos. Los animales se introdujeron en jaulas, 1 por jaula, en un ambiente de temperatura controlada con períodos alternativos de 12 horas de luz y oscuridad y se les permitió acceso libre al alimento y al agua. Antes de cada estudio, los animales se habituaron al ambiente durante al menos 7 días. Se utilizaron ratones hembras CD1 (Sprague-Dawley) con un peso de 22-28 gramos para la determinación de la dosis máxima tolerada (DMT). Todos los animales se mantuvieron de acuerdo con las directrices del Comité sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council.

15 Las formulaciones de bupivacaína e hidrocloreuro de bupivacaína encapsulados en LMV preparadas como se ha descrito antes se diluyeron en solución salina normal de forma que un volumen constante de 1 mL contenía una dosis a concentraciones de 2,1 %, 1,0 %, o 0,5 % (p/v) de bupivacaína. Se confirmaron las concentraciones solubilizando una alícuota de 50 µl de la formulación de LMV en 1 mL de alcohol isopropílico, seguido por dilución en agua y valoración por un método de HPLC publicado previamente tal como se ha descrito (P. Le Guevello *et al.*, J.

Chromatography 622:284-290, 1993). El análisis por HPLC de las formulaciones de LMV reveló que menos del 5 % de la bupivacaína total estaba presente en la formulación como bupivacaína no encapsulada.

Se realizaron estudios de anestesia por infiltración en los cobayas de ensayo utilizando un modelo modificado de punción de roncha intracutánea como se ha descrito (R. H. de Jong *et al*, *Anesth. Analog* 59:401-5, 1980). El día anterior al experimento, se cortó el pelo de la espalda de los animales. Cada animal recibió o bien una dosis de bupivacaína encapsulada en LMV (concentraciones de 0,5, 1,0 o 2,1 por ciento (p/v) de bupivacaína) o bien de bupivacaína no encapsulada (concentraciones de 0,25, 0,5, 0,75 o 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína), que produjo una roncha. Los bordes de la roncha se marcaron con tinta indeleble. La reacción a las punciones en el sitio de inyección se comprobó justo antes de la inyección (tiempo cero) y 15 minutos, 3, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas después de la inyección de bupivacaína encapsulada en LMV, y cero, 5, 15, minutos, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 horas después de la inyección de hidrocloreto de bupivacaína. Las punciones se aplicaron primero a un área de control fuera de la roncha en cada punto de tiempo. Después de observar la reacción normal del animal a la punción (respuesta de vocalización), se aplicaron seis punciones dentro de la roncha y el número de punciones a las que no reaccionaron los cobayas se registraron como no respuestas. Se aplicó cada punción a un intervalo de 3-5 segundos. Todos los animales respondieron con vocalización a las seis punciones en la línea base.

Los datos obtenidos en animales indican un rápido comienzo de la anestesia después de una dosis única intracutánea de bupivacaína encapsulada en LMV, seguido por una duración prolongada de anestesia sensorial que permanece hasta 28 horas, dependiendo de la concentración de bupivacaína en los LMV administrados. El rápido comienzo de la anestesia se puede atribuir, en parte, a una fracción baja, pero significativa de bupivacaína no encapsulada (aproximadamente 5 % del total) en los lotes de LMV que encapsulan la bupivacaína utilizados en estos experimentos. La duración de la anestesia obtenida por el uso de estas formulaciones puede cubrir el peor período post-quirúrgico, las primeras 24 horas. Una duración mayor de la anestesia, tal vez 7 días o más, sería más apropiada para el dolor crónico, tal como el dolor de cáncer o dolor neuropático.

#### **Ejemplo 4: Análisis de los datos de los estudios de eficacia**

Se trazaron las curvas de eficacia del anestésico como el número de no respuestas en función del tiempo. Se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) por la regla del trapecio hasta el último punto de datos. Con respecto a la figura 1A, las concentraciones de bupivacaína encapsulada en LMV en tanto por ciento, en peso por volumen (% p/v) fueron 2,1 % (●), 1,0 % (■), y 0,5 % (▲). Con respecto a la figura 1B, las concentraciones de bupivacaína no encapsulada en tanto por ciento, en peso por volumen fueron 0,25 % (▽), 0,5 % (Δ), 0,75 % (◊), y 1,0 % (◻). Cada punto de datos representa la media de 5 a 6 animales. Las barras de error representan el error típico de la media (SEM).

La evaluación de la respuesta a las punciones demostró que se había alcanzado la anestesia local completa (condición de no respuesta) en un plazo de 15 minutos después de la administración intracutánea de la formulación en LMV de bupivacaína (figura 1A) o de hidrocloreto de bupivacaína no encapsulado (figura 1B).

La figura 2 muestra la duración del efecto anestésico medido por el tiempo que transcurre hasta la mitad de la respuesta máxima (R3) para las diferentes dosis de la formulación de LMV (círculos rellenos) y para el fármaco no encapsulado (círculos vacíos). Cada punto de datos representa la media y el error típico de la media (SEM) de 5 a 6 animales. Estos resultados demuestran que la duración del efecto anestésico era dependiente de la concentración en ambos casos. Sin embargo, las formulaciones de LMV que contienen concentraciones de 0,5 y 1,0 por ciento en peso de fosfato de bupivacaína eran 3,2 y 2,9 veces más prolongadas, respectivamente, en comparación con dosis equiparables de hidrocloreto de bupivacaína.

#### **Ejemplo 5: Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT)**

La determinación de la dosis máxima tolerada (DMT) se realizó en ratones utilizando una prueba subcutánea bien conocida en la técnica (R. H. de Jong *et al.*, *Anesthesiology* 54:177-81, 1981). A grupos de tres ratones se administró a cada uno inyecciones de 780 o 980 mg por kg de peso corporal de la formulación de LMV descrita antes que contiene sulfato de bupivacaína en dos dosis divididas de 500 µl cada una (volumen total 1,0 mL). Se administraron las dosis en secuencia rápida en cada flanco. En grupos control de 3 ratones cada uno recibió una de las dosis de ensayo como una dosis única de 10, 20, 30 o 50 mg/kg de peso corporal de hidrocloreto de bupivacaína no encapsulado. La dosis máxima tolerada se definió como la dosis más alta a la que ninguno de los animales experimentó toxicidad sistémica.

Estos estudios demostraron que ninguno de los ratones que recibieron hidrocloreto de bupivacaína libre por vía subcutánea presentó signos de toxicidad sistémica a dosis de 10 y 20 mg/kg. Sin embargo, a las dosis de 30 y 50 mg/kg, dos de tres, y tres de tres animales, respectivamente, desarrollaron toxicidad. Por otro lado, la formulación de LMV de sulfato de bupivacaína administrada subcutáneamente a una dosis de 780 mg/kg no demostró ningún signo de toxicidad sistémica en ninguno de los animales; mientras que tres de tres animales presentaron toxicidad a una dosis de 980 mg/kg. Por lo tanto, se estimó que la DMT para el hidrocloreto de bupivacaína no encapsulado era aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, y para el sulfato de bupivacaína encapsulado en LMV se estimó en aproximadamente 780 mg/kg de peso corporal.



La toxicidad más grave procedente del uso de los anestésicos locales es apoplejía o colapso cardiovascular. Consecuente con el pico más bajo de la concentración en suero encontrado después de la administración de las formulaciones en LMV de bupivacaína, la dosis máxima tolerada para la bupivacaína encapsulada en LMV fue muchas veces más alta que la de hidrocloreuro de bupivacaína. Estos datos podrían predecir un aumento del perfil de seguridad sistémica para las composiciones producidas por el método de esta invención. Los perfiles de toxicidad de los ingredientes activos e inactivos están bien definidos, lo que reduce la probabilidad de encontrar una toxicidad inesperada.

#### Ejemplo 6: Estudios farmacocinéticos

Los resultados farmacocinéticos *in vivo* de las formulaciones en LMV de bupivacaína y de hidrocloreuro de bupivacaína libre se compararon después de la administración a un grupo de cobayas de una dosis única intracutánea de 1 mL de la formulación de LMV que contiene 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína, o una dosis de 0,5 por ciento (p/v) de hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado. Se seleccionó la concentración más baja para el hidrocloreuro de bupivacaína porque los animales de 400-600 gramos no pudieron tolerar una dosis de concentración 1,0 % del fármaco no encapsulado. En los animales que recibieron hidrocloreuro de bupivacaína libre, se recogieron muestras a 0 y 30 minutos, y 1, 3, 6, y 9 horas después de la inyección, mientras que en los animales que recibieron las formulaciones de LMV de bupivacaína se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 18, 24, 48, y 72 horas después de la inyección. En cada punto de tiempo, en primer lugar se anestesiaron 3 o más animales con halotano y después se desangraron por punción cardíaca. Se obtuvieron muestras de suero por centrifugación de la sangre entera coagulada. Se recogió la piel de alrededor del sitio de la inyección con bordes de 3 cm, junto con una capa de 2-3 mm del tejido subcutáneo subyacente. Las muestras de piel y suero se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el análisis.

Se obtuvo la cantidad de bupivacaína total que permanece en el sitio de inyección triturando el tejido seguido por una homogenización total en agua utilizando un homogeneizador Polytron, (Brinkman, Littau, Switzerland). Se extrajo la bupivacaína del homogeneizado y se analizó por HPLC utilizando un método previamente publicado (Le Guevello *et al.*, J. Chromatography 622:284-290, 1993). Se determinó la concentración de bupivacaína en suero por extracción seguida por HPLC (Le Guevello *et al.*, *supra*). Como patrón interno se utilizó la tetracaína añadida intencionadamente a cada muestra antes de la extracción. El límite de detección del ensayo fue de 20 ng/mL.

Se analizaron los datos farmacocinéticos obtenidos de las muestras utilizando un modelo no compartimental (WinNonlin software, Scientific Consulting, Inc., Apex, NC). Los parámetros calculados fueron la cantidad de fármaco que permanece en el sitio de inyección, el área bajo la curva "cantidad frente a tiempo" (AUC), y la semivida del fármaco ( $t_{1/2}$ ). Además de la AUC y de la semivida, se registró también la concentración máxima ( $C_{max}$ ) para la farmacocinética de bupivacaína en suero.

Se utilizó un análisis simple de la varianza (ANOVA) para determinar por separado la dependencia de la dosis para las diferentes formulaciones de fármaco y vías de administración (en LMV o como fármaco libre) así como para la comparación entre formulaciones. Se utilizaron pruebas de Student-Newman-Keuls en todos los análisis ANOVA. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por estos métodos se resumen en la Tabla 2 que sigue.

Tabla 2

Parámetros farmacocinéticos después de una única inyección intracutánea de DepoBupivacaína al 1,0 % o de hidrocloreuro de bupivacaína al 0,5 %

	Bupivacaína encapsulada en LMV	Hidrocloreuro de bupivacaína
Concentración de fármaco administrada	1,0 %	0,5 %
Cantidad máxima (mg), piel	11,6	3,8
$T_{1/2}$ (hora), piel	12,0	1,3
AUC (mg*h), piel	236	2,9
$C_{max}$ ( $\mu$ g/mL), suero	2,9	6,5
$t_{1/2}$ (h), suero	20,5	2,1
AUC ( $\mu$ g*h*mL <sup>-1</sup> ), suero	56,1	21,2
$r^2$ , piel	0,97	0,85
$r^2$ , suero	0,89	0,93

La "concentración de fármaco administrada" está en unidades de peso de anestésico por volumen de LMV. La "cantidad máxima" muestra la cantidad máxima de la sustancia indicada en la muestra de piel. La " $C_{max}$ " es la concentración máxima de la sustancia indicada en suero. La " $t_{1/2}$ " es la semivida del fármaco. El "área AUC" es el área bajo la curva "cantidad frente a tiempo". El " $r^2$ " es el cuadrado del coeficiente de correlación de la muestra.

- 5 Como muestran estos resultados, después de la administración intracutánea de la formulación de LMV, la cantidad total de fármaco en el tejido del sitio de la inyección disminuyó con una semivida de 12 horas en comparación con 1,3 horas para el hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado. La concentración máxima de bupivacaína en suero después de una dosis única intracutánea de la formulación de LMV al 1,0 % disminuyó 2,2 veces (4,4 veces cuando se corrigió la dosis) en comparación con la observada con hidrocloreuro de bupivacaína al 0,5 %. Similarmente, la
- 10 semivida terminal en suero para las formulaciones de LMV al 1,0 por ciento (p/v) fue de 20,5 horas en comparación con las 2,1 horas para el hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado a una concentración de 0,5 por ciento (p/v).

El AUC en el sitio de inyección local para la formulación de LMV fue de 81 veces (41 veces cuando se corrigió la dosis) la del hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado, y el AUC en suero fue de 2,6 veces (1,3 veces cuando se corrigió la dosis) la del hidrocloreuro de bupivacaína.

- 15 Las figuras 3A y 3B muestran el resultado de los estudios farmacocinéticos. La figura 3A muestra la cantidad de bupivacaína encapsulada en LMV a una concentración de 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos rellenos) o la cantidad de hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado a una concentración de 0,5 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos vacíos) que permanece en un sitio de inyección en los puntos de tiempo analizados a lo largo de un período de 72 horas. La figura 3B muestra la concentración en suero ( $\mu\text{g/mL}$ ) de bupivacaína después de una única
- 20 dosis intracutánea de la formulación encapsulada en LMV de bupivacaína al 1,0 por ciento (p/v) (círculos rellenos) o de hidrocloreuro de bupivacaína no encapsulado a una concentración de 0,5 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos vacíos). Cada punto de datos representa la media y el error típico de la media (SEM) de 3 a 6 animales. Se utilizó un nivel de significancia estadística de 0,05 para todos las pruebas.

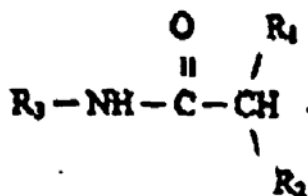
- 25 Los datos farmacocinéticos obtenidos en los Ejemplos de esta memoria fueron concordantes con una duración prolongada del efecto anestésico. La duración de la anestesia fue de 2,9 a 3,2 veces más larga para la bupivacaína encapsulada en LMV, y la semivida en el sitio de inyección fue 9,2 veces más larga en comparación con el hidrocloreuro de bupivacaína. La concentración máxima en suero disminuyó 4,5 veces (normalizada a dosis equivalentes), y la semivida terminal en suero aumentó 9,8 veces después de la administración de bupivacaína encapsulada en LMV en comparación con el hidrocloreuro de bupivacaína.

- 30 En conclusión, una única dosis intracutánea de bupivacaína encapsulada en LMV produjo una duración prolongada de anestesia (hasta 28 horas) y un aumento de 9,2 veces (sin corrección para la dosis) de la semivida en el sitio de inyección local en comparación con el hidrocloreuro de bupivacaína. La dosis máxima tolerada aumentó 39 veces en comparación con el hidrocloreuro de bupivacaína. Por lo tanto las formulaciones de la invención tienen utilidad para la anestesia por infiltración sostenida sin necesidad de una perfusión continua y pueden aumentar la satisfacción del
- 35 paciente.

Algunas realizaciones adicionales de la invención incluyen las siguientes:

1. Una composición farmacéutica que comprende:
  - a) un liposoma multivesicular que comprende al menos un tipo de lípido anfipático, y
  - 40 al menos un tipo de lípido neutro; y
  - b) una fase acuosa que comprende sales polihidroxicarboxilato y sales minerales di- o tri-próticas de anestésicos tipo amida, en la que la fase acuosa está encapsulada dentro del liposoma multivesicular.
2. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que la fase acuosa comprende además ácido clorhídrico.
- 45 3. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que el lípido anfipático se proporciona en mezcla con colesterol, esteroides vegetales, o combinaciones de los mismos.
4. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que las sales minerales di- o tri-próticas de los anestésicos tipo amida se seleccionan del grupo que consiste en sulfatos, fosfatos y combinaciones de los mismos.
- 50 5. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que las sales polihidroxicarboxilato del anestésico tipo amida se seleccionan del grupo que consiste en glucuronato, gluconato, tartrato y combinaciones de los mismos..

6. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que el lípido anfipático se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, cardiolipinas, diacil-dimetilamonio-propanos y estearilaminas.
- 5 7. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que el lípido neutro se selecciona del grupo que consiste en triglicéridos, diglicéridos, etilenglicoles y escualeno.
8. La composición farmacéutica del párrafo 1, en la que el anestésico tipo amida es una xilidida.
9. La composición farmacéutica del párrafo 8, en la que la xilidida se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína y sus estereoisómeros.
- 10 10. La composición farmacéutica del párrafo 8, en la que la xilidida tiene la siguiente estructura:



- en la que R<sub>1</sub> es una alquilamina secundaria o terciaria o una alquilenamina secundaria o terciaria, R<sub>2</sub> es hidrógeno, alquilo o alquileo con enlaces adicionales a R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> es un sustituyente fenilo sustituido con alquilo.
11. La composición farmacéutica del párrafo 10, en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en N-alquilpiperidina y N-alquilpirrolidina.
12. La composición farmacéutica del párrafo 10, en la que R<sub>3</sub> es el sustituyente 2,6-dimetilfenilo.
13. Un procedimiento para preparar una composición anestésica encapsulada en liposomas multivesiculares, comprendiendo el procedimiento:
- a) formar una emulsión "agua-en-aceite" a partir de una primera fase acuosa y una fase orgánica volátil, donde la primera fase acuosa comprende
- sales polihidroxicarboxilato y sales minerales di- o tri-próticas de anestésicos tipo amida,
- y la fase orgánica volátil comprende
- un disolvente orgánico volátil,
- al menos un tipo de lípido anfipático, y
- al menos un tipo de lípido neutro;
- b) dispersar la emulsión de tipo "agua-en-aceite" en una segunda fase acuosa para formar esférulas de disolvente; y
- c) separar el disolvente orgánico volátil de las esférulas de disolvente para formar un anestésico tipo amida encapsulado en liposomas multivesiculares suspendido en la segunda fase acuosa.
14. El procedimiento del párrafo 13, en el que el anestésico tipo amida es una xilidida.
15. El procedimiento del párrafo 14, en el que la xilidida se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína y sus estereoisómeros.
16. Un método para anestesiarse localmente a un sujeto, comprendiendo el método inyectar subcutáneamente, intracutáneamente, o por bloqueo de un nervio local, la composición farmacéutica del párrafo 1 a un sujeto que necesite anestesia.
17. El método del párrafo 16, en el que el anestésico tipo amida es una xilidida.
18. El método del párrafo 17, en el que la xilidida se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína y sus estereoisómeros.

19. Un método para aumentar la carga de fármaco en los liposomas multivesiculares convirtiendo un anestésico tipo amida en una mezcla binaria de sales en la que dos contraiones se derivan de un ácido polihidroxicarboxílico y un ácido mineral diprótico o triprótico.

5 20. El método del párrafo 19, en el que el ácido polihidroxicarboxílico se selecciona del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y combinaciones de los mismos.

21. El método del párrafo 19, en el que el ácido mineral diprótico o triprótico se selecciona del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y combinaciones de los mismos.

22. El método del párrafo 19, en el que el anestésico tipo amida es una xilidida seleccionada del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína y sus estereoisómeros

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para preparar una composición de liposomas multivesiculares que contiene un anestésico tipo amida, que comprende
  - a) preparar un primer componente acuoso que comprende un ácido en cantidad suficiente para solubilizar dicho anestésico tipo amida o una de sus sales, siendo seleccionado dicho ácido del grupo que consiste en polihidroxicarboxilato, ácido mineral diprótico, ácido mineral triprótico, y combinaciones de los mismos;
  - b) preparar un componente lipídico que comprende al menos un disolvente orgánico, al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro que carece de un grupo de cabeza hidrófilo;
  - c) mezclar dicho primer componente acuoso y dicho componente lipídico para formar una emulsión "agua-en-aceite",
  - d) mezclar dicha emulsión "agua-en-aceite" con un segundo componente acuoso para formar esférulas de disolvente; y
  - e) separar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente para formar la composición de liposomas multivesiculares que contiene el anestésico tipo amida.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer componente acuoso comprende además ácido clorhídrico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polihidroxicarboxilato se selecciona del grupo que consiste en glucuronato, gluconato, tartrato y combinaciones de los mismos..
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido es ácido fosfórico.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un lípido anfipático se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles y sus combinaciones.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho al menos un lípido anfipático incluye una fosfatidilcolina, y preferiblemente dicha fosfatidilcolina es dierucoilfosfatidilcolina.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho al menos un lípido anfipático incluye un fosfatidilglicerol, y preferiblemente dicho fosfatidilglicerol es dipalmitoilfosfatidilglicerol.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un lípido neutro que carece de un grupo de cabeza hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilinoleína, tributirina, tricaproína, tricaprilina, tricaprina, y combinaciones de las mismas, y preferiblemente dicho al menos un lípido neutro que carece de un grupo de cabeza hidrófilo es tricaprilina.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anestésico tipo amida se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, y prilocaína, o sus sales farmacéuticamente aceptables.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anestésico tipo amida es bupivacaína o una de sus sales.
11. Una composición de liposomas multivesiculares que contiene un anestésico tipo amida; al menos un ácido seleccionado del grupo que consiste en un ácido mineral diprótico, un ácido mineral triprótico, y un polihidroxicarboxilato o combinaciones de los mismos; al menos un lípido anfipático; al menos un lípido neutro que carece de un grupo de cabeza hidrófilo; y, opcionalmente, un colesterol y/o un esteroil vegetal para uso en proporcionar anestesia regional a un sujeto.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que al menos un ácido es ácido fosfórico.
13. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho al menos un lípido anfipático se selecciona del grupo que consiste en dierucoilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilglicerol.
14. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho al menos un lípido anfipático comprende dierucoilfosfatidilcolina.
15. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho al menos un lípido anfipático comprende dipalmitoilfosfatidilglicerol.
16. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho al menos un lípido neutro comprende tricaprilina.

17. La composición de la reivindicación 11, en la que el anestésico tipo amida se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína, sus estereoisómeros, y sus combinaciones.
18. La composición de la reivindicación 11, en la que el anestésico tipo amida es bupivacaína.
- 5 19. La composición de la reivindicación 11, en la que el ácido es ácido fosfórico, dicho al menos un lípido anfipático comprende dierucoilfosfatidilcolina y/o dipalmitoilfosfatidilglicerol, dicho al menos un lípido neutro comprende tricaprilina y dicho anestésico tipo amida es bupivacaína.
- 10 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en la que la composición que comprende liposomas multivesiculares se administra intracutáneamente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intratecalmente, intramuscularmente, o por bloqueo de un nervio local o regional.

FIGURA 1A

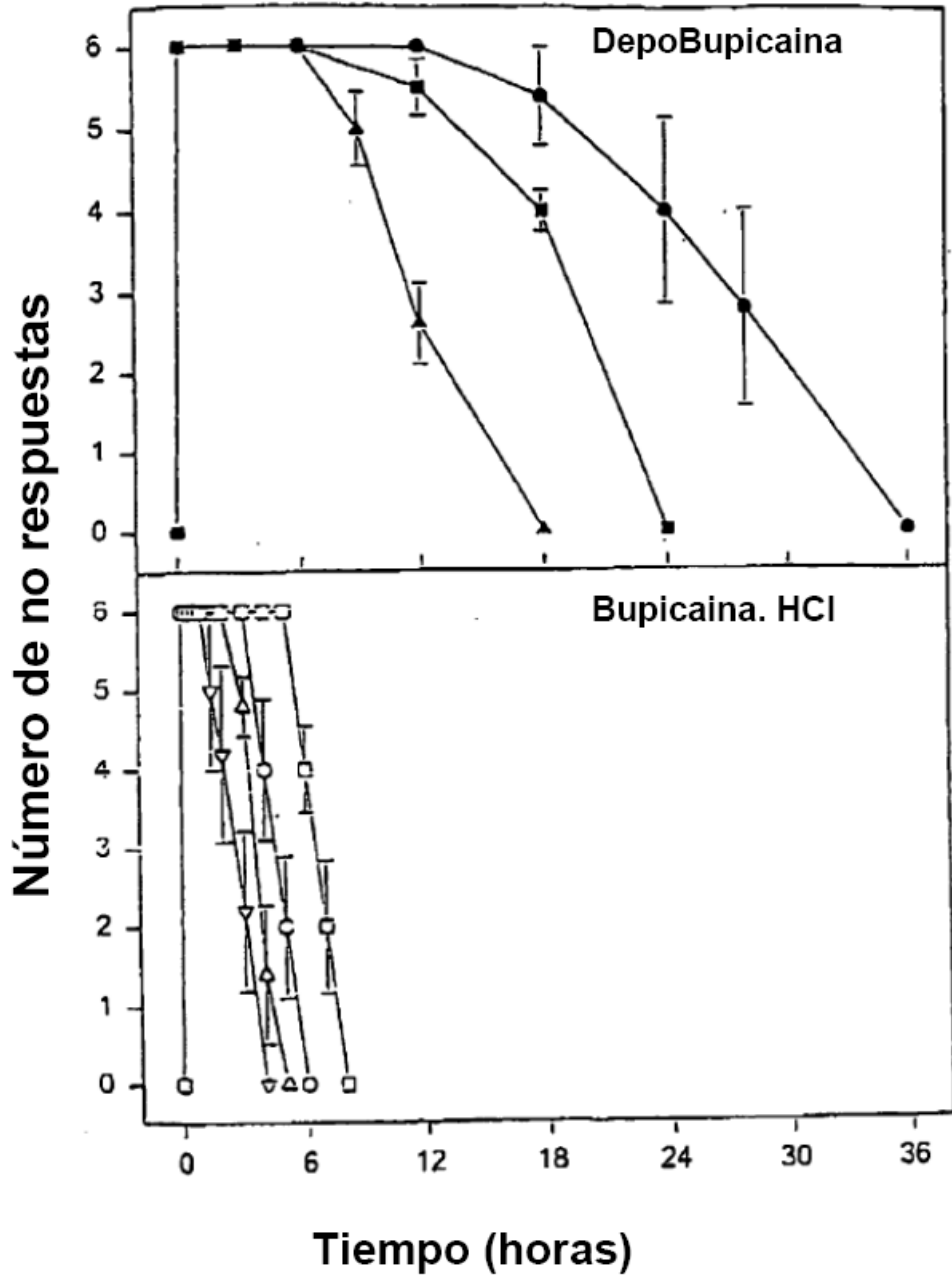


FIGURA 1B

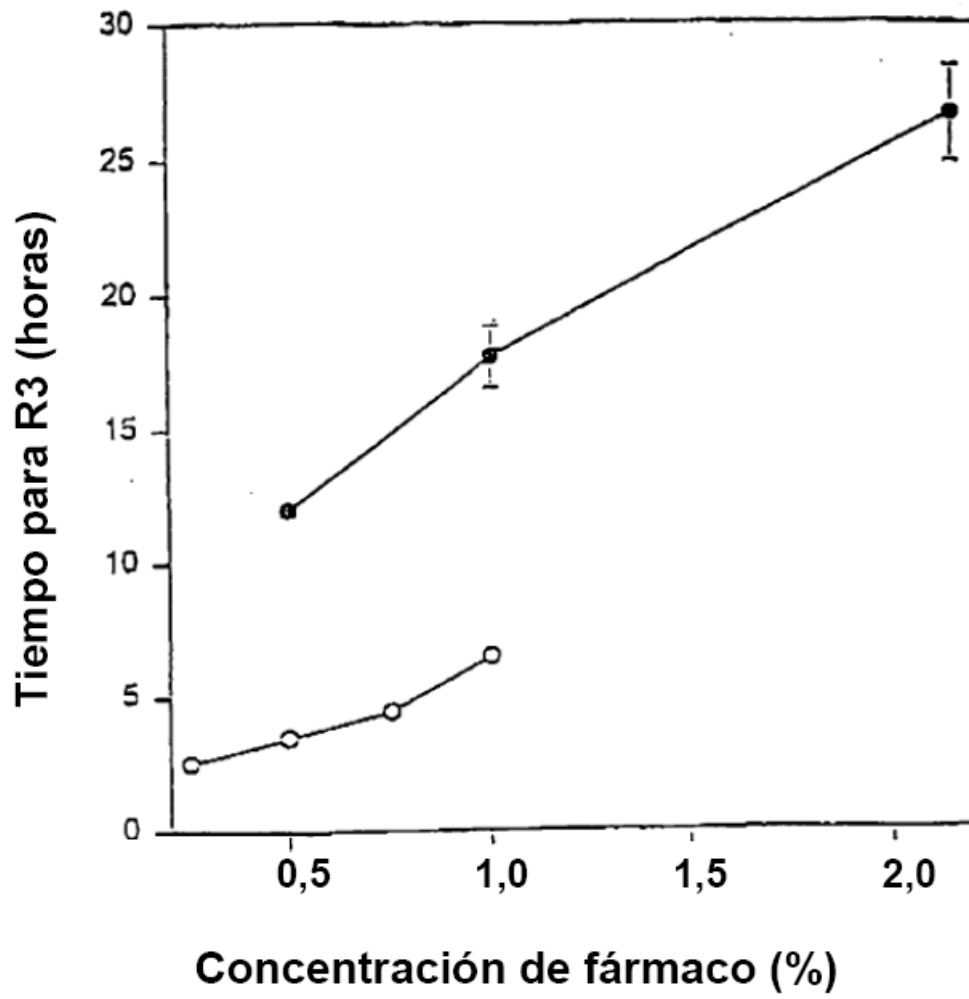
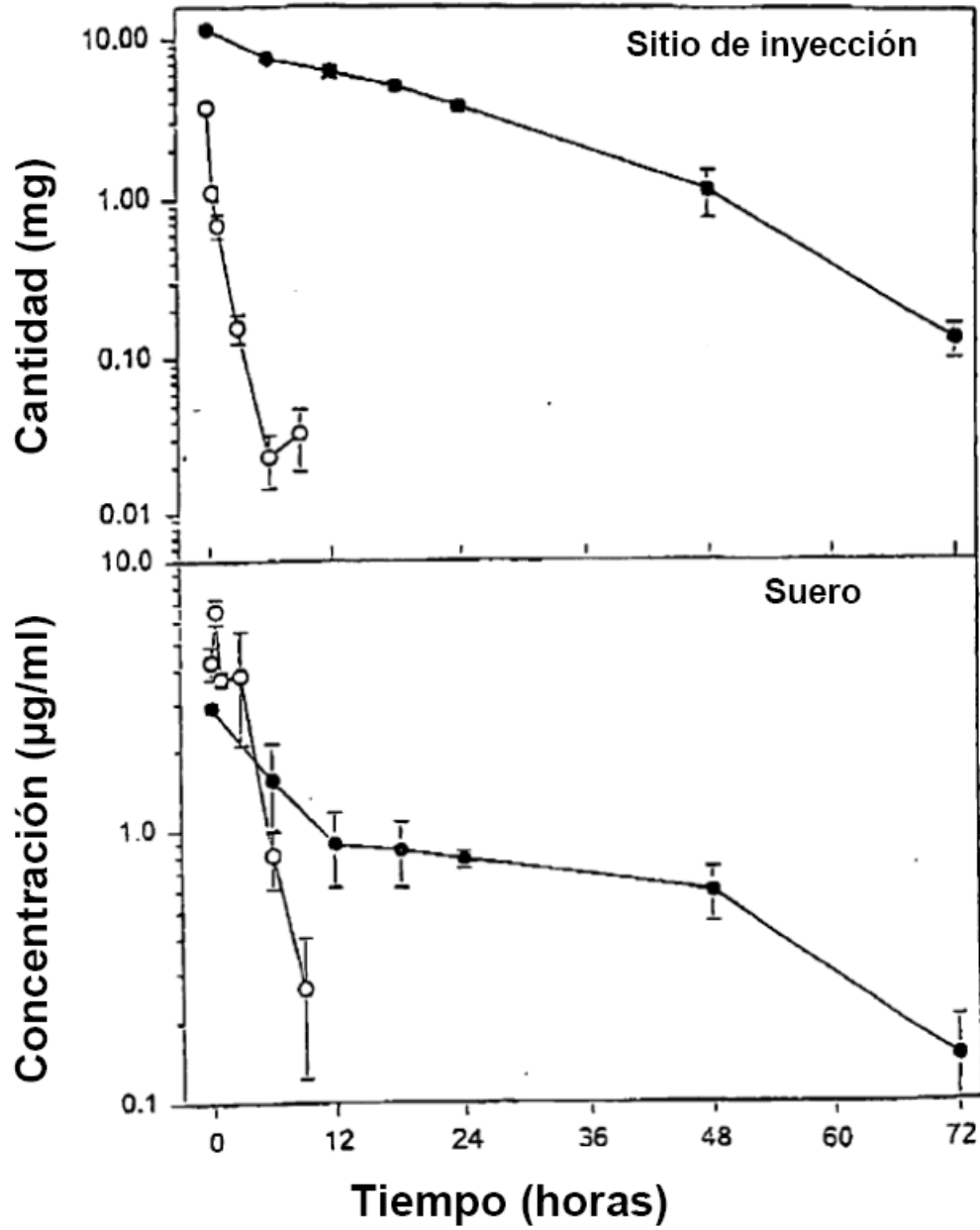


FIGURA 2



**FIGURA 3A**



**FIGURA 3B**